十字花科蔬菜與馬鈴薯基因轉移

曾夢蛟　蔡啓仁　吳幸麗

國立中興大學園藝系

本省自光復以來，蔬菜之栽培面積、種類不斷地擴大及增加。爲求高品質蔬菜生產，有待進一步改善育種技術的必要。將組織培養及分子生物技術合併到育種工作的計畫中，是目前改良作物的重要步驟。將外來基因導入植物體內的成功例子，已用來增加我們對植物生長發育與生理的調節有更進一層的瞭解。其它尙有導入抗殺草劑、抗蟲劑、抗生物藥劑、免疫蛋白、螢光酵素等基因到植物之實際應用的報導。

馬鈴薯爲世界性最重要非穀類糧食作物，提供人類大量的能量及營養來源，較其他作物而言更有增加單位栽培面積及品質之潛力。新的基因轉移及細胞培養技術，使外來基因導入植物細胞並再生成轉殖株成爲可能，這也提供馬鈴薯品種改良之可能新途徑。十字花科蔬菜更是爲本省重要的經濟蔬菜作物。本文即簡要探討目前常用之植物基因轉移方法及回顧過去十年來在馬鈴薯及十字花科蔬菜基因轉移之研究成果。

植物基因轉移的方法及評估

植物基因轉移系統可區分爲間接基因轉移(indirect gene transfer)及直接基因轉移(direct gene transfer)兩種。

一、間接基因轉移：

*Agrobacterium*法(Lindsey and Jones, 1990)。*Agrobacterium*是最常用來做爲間接基因轉移的媒體。由*Agrobacteria*主導的基因轉移主要有*Agrobacterium tumefaciens*和其相近的*Agrobacterium rhizogenes*。兩者都是存在於土壤中的植物病原性細菌。當*A. tumefaciens*感染植物的傷口時會造成傷口附近細胞的增殖而使植物形成冠癭腫瘤(crown gall tumor)。*A. rhizogenes*則是使植物產生毛狀根群(hairyroots)。其原因在於當*Agrobacterium*接觸到植物的細胞，其內含的Ti質體(tumor inducing plasmid)上一段T-DNA會由菌體轉移到植物細胞內，進而嵌入植物的染色體之中。T-DNA上包含了一段*onc*基因可使植物體內生auxin含量升高，進而刺激植物細胞的分裂，造成腫瘤。Ti質體，除T-DNA外另外必須有*vir*基因的存在。*vir*基因和*Agrobacterium*染色體上的*chr*基因共同作用，T-DNA才可以轉移進入細胞之中。T-DNA如何由*Agrobacterium*穿過植物細胞壁，嵌入染色體中的過程並不完全瞭解

。但分析T-DNA嵌入寄主染色體的模式時發現在T-DNA嵌入點的兩邊恰好都有二個25bp的direct repeated sequence稱之為left border及right border，基因須位於left border及right border之間，或至少有一border存在時，才會被轉移進入植物細胞中。因此，只要將外來的基因接入Ti質體的T-DNA中，便可利用*Agrobacterium*將外來的基因轉移到植物的染色體組之中。

藉由*Agrobacterium*雖可導入外來的基因，但仍存在著問題。*Agrobacterium*在轉移T-DNA時，同時會將致病基因送入植物細胞內。且野生型*Agrobacterium*的Ti質體相當大，約在200kb左右，因此不利於遺傳工程之操作。解決的辦法乃將*onc*致病基因去除，但仍保留border sequence，形成所謂disarmed Ti質體，同時加入可篩選基因到T-DNA中。篩選基因通常是一些抗藥性基因例如抗kanamycin的基因(NPTII)，因此可使轉形細胞在含有抗生素的培養基下生長，未轉形細胞則無法生長而達到篩選的目的。至於T-DNA過大的問題則將*vir*基因置於另一個disarmd Ti質體上。因此使含有T-DNA的Ti質體縮小，而*vir*基因仍可發揮其應有的功能。這個縮小的Ti質體再經由修改，使其成為泛寄主的載體，可以存在於*E. coli*及*Agrobacterium*內以利於遺傳工程上之操作。如可將外來的基因及可篩選基因接入T-DNA之中，然後將此構築好的Ti質體送入*E. coli*中複製，再經由helper *E. coli*的幫助，行tripartite mating將Ti plasmid由*E. coli*傳送到*Agrobacterium*上，故當以此*Agrobacterium*去感染植物組織便可將外來基因送入植物染色體中而不會有前述的問題產生。

*Agrobacterium*轉移法可利用植物的葉圓片、根、莖段或原生質體和*Agrobacterium*共同培養，而使*Agrobacterium*感染植物細胞。然後去除*Agrobacterium*再將經轉移的細胞或組織培養在含有生長荷爾蒙及抗生素的培養基下。如此只有獲得轉形的細胞可繼續生長。再將這些轉形組織移至仍含有抗生素的分化培養基下使經由organeogenesis或embryogenesis產生出再生植株。經由*Agrobacterium*轉移法產生的轉殖植物種類已有很多報導(Lindsey and Jones, 1990)。

*Agrobacterium*的基因轉移效率約在0.1～5％之間，但有高達50％的報導(Binns, 1990)。其轉移率也會有同一種植物不同品種而有所差異，某些品種很容易轉移成功，某些品種則轉移率很低，另外一些品種只能針對某一時期的特定組織行特別處理才可轉移成功。雖然*Agrobacterium*轉移法是現有多種轉移法中成功例子最多的，但僅限於雙子葉植物。至今許多試驗的嘗試仍無法證實*Agrobacterium*是轉移基因進入單子葉植物的有效系統。

二、直接基因轉移法：

1.Polyethylen glycol（PEG）法

最早的報導發現poly-L-ornithine（PLO）會增加病毒感染原生質體的機率，後續的實驗也發現PEG也能促進原生質體及吸收病毒及病毒核酸。因此自1970年代，科學家便嘗試是否這種技術可將分離出的Ti質體轉移進入原生質體之中。Davey *et al.*, (1980)將萃取自octopine strain的*Agrobacterium*之supercoiled Ti質體和矮牽牛的原生質體混合加入PLO使其互相作用。經由培養長出的colonies發現可在不含荷爾蒙的培養

基下生長，而且有octopine 的合成。Krens(1982)也證實ＰＥＧ能使Ti質體進入煙草葉肉原生質體中。分析這些進入煙草和矮牽牛原生質體中嵌入Ti質體結構及組成都和由*Agrobacterium* 所轉移的Ｔ-ＤＮＡ不同。在矮牽牛的轉形組織發現Ｔ-ＤＮＡ則被切成數個片段。Ｔ-ＤＮＡ的 bordor在這個情況下和Ｔ-ＤＮＡ的嵌入植物染色體組及表現沒有任何關係 (Devey *et al.*, 1989)。此外，利用帶有突變 *vir* 基因的Ti質體作直接基因轉移發現也可產生轉形效果，也就是 *vir* 基因的Ti質體作基直接基因轉移法是非必要的。這些報導的轉形效率約在 10^{-4}～10^{-5} 之間。隨後的研究發現Ｔ-ＤＮＡ序列對植物細胞欲表現外來基因或造成穩定轉移而言是非必要的。Paszowsk *et al.*,(1984) 將帶有CaMV 35S啓動子及ＮＰＴII基因的質體（pABD1）混合菸草原生質體與PEG6000，然後利用含有kanamycin的培養基篩選轉殖植株，分析轉殖植株後代發現外來基因依孟德爾性狀遺傳至子代之中。

PEG (polyethylene glycol) 是極度親水性的分子，會吸走溶液中的"free water"，因此在高濃度ＰＥＧ存在下，ＤＮＡ等大分子便會沉澱下來。原生質體膜帶負電且ＤＮＡ分子也帶負電，因此ＤＮＡ和原生質體的作用便很有限。在極高濃度ＰＥＧ(30％～40％)之下，ＰＥＧ似乎會減低電荷相斥的作用，原生質膜因而可緊密的互相接觸，造成lipid bilayer互相融合進而造成細胞融合。ＰＥＧ也被證明能刺激原生質體的內胞飲作用(endocytosis) 使原生質體能吸入葉綠體，liposomre 或細菌等大分子。雖然如此對原生質體如何吸入ＤＮＡ，ＰＥＧ所扮演的角色仍不清楚，但可能是ＰＥＧ使ＤＮＡ沉澱到原生質膜上，同時誘導原生質體行內胞飲作用而將ＤＮＡ吸入其內(Draper *et al* ., 1988)。使用ＰＥＧ轉移法時ＰＥＧ的濃度約在15％～25％之間，原生質體密度則在 10^6/ml左右。Negrutium *et al.*, (1987) 報導PEG6000、4000皆可使用。PEG4000的效果略優於PEG6000，且較分子量低的ＰＥＧ爲優。同時菸草原生質體在含有15mM Mg^{2+} 緩衝液中可增加ＤＮＡ吸收的效果。另有證據顯示當ＤＮＡ濃度增加，轉殖原生質體之 transient expression 越高。ＤＮＡ濃度上限約在50～200 μg/ml 左右 (Wilson *et al.*, 1989)，依原生質體來源而有所不同。此外，如果ＰＥＧ的濃度超過25％則原生質體死亡及融合的數目都會增加，因此便很難得到轉殖個體。

2.電穿孔法(Electroporation)

直接基因轉移到原生體的另一個方法乃使用電穿孔法。依Zimmermann(1986)的報導當給予原生質體一外加電場時，會造成原生質膜內外電位差。當外加電場夠大時，膜內外的電位差使膜崩解而使原生質膜產生孔洞。當給予適當大小及時間的電場時，原生質膜的破壞及回復是有可逆性的。因此外在的ＤＮＡ及大分子物質便可經由孔洞進入原生質體之中。電場的強度及施加的時間是影響電穿孔法轉移基因效率的主要因素。而電場強度的施加則和原生質體大小及溶液中存在的離子濃度有關。通常電穿孔法在二種情況下可造成有效的直接基因轉移，一是在高電壓短時間(1.5KV,10 μs）的情況下(Shillito *et al.*, 1985)，另一是在低電壓長時間的電擊之下(350V,10us) (Zimmermann，1986)。Shillito *et al.*,(1985) 把煙草的原生質體給予45℃，5分鐘的熱休克處理加入含

有NPTII基因的pABD1質體及PEG給予1.0～2.5 KV/cm 電擊，得到穩定的轉移植株，且其轉移效率比單獨使用PEG高出1,000倍。Fromm *et al.*, (1985)則使用CAT爲報導基因，在350V，54ms之條件電擊可使玉米原生質體表現出最高的CAT活性。

實驗也證明直接基因轉移法可將二個不同質體在轉移過程中同時送入原生質體之中。Leszek *et al.*, (1989) 將帶有GUS基因的pPUR及帶有NPTII基因的pKAN質體以PEG共同轉移至玉米原生質體之中。在抗kanamycin 的 colonies 中，50%表現GUS基因活性。Tagu *et al.*, (1990)使用矮牽牛爲材料也有同樣的報導。

在廣泛使用煙草爲直接基因轉移的模式之外，經濟作物原生質體的基因轉移也是研究的重點。Guerche *et al.*,(1987)利用電穿孔法將帶有NPTII的pABD1質體送入 *Brassica napus* 的葉肉細胞原生質體之中。其轉殖植株抗kanamycin的性狀有依孟德爾遺傳定律轉移至下一代的現象。Koehler(1987) 則將帶有NPTII基因的pLGV2013 質體以電穿孔法送入豆科植物 *Vignaitifolia*原生質體中，結果發現0.58%的colonies帶有抗kanacymin的性狀。

由於重要單子葉穀類作物如玉米、稻子無法使用 *Agrobacterium* 作有效基因轉移，直接基因轉移對這些單子葉作物便顯得很重要。Rhodes *et al.*,(1988)利用電穿孔法將NPTII基因導入玉米原生質體之中得到抗kanamycin玉米轉殖植株，但很不幸這些玉米是不稔性的。Zhang *et al.*, (1988)則把NPTII基因轉入水稻胚細胞懸浮培養之原生質體中分析其中再生株發現都有NPTII基因存在，但只有二棵表現出NPTII基因的活性其中有一棵結出種子。Zhang *et al.*,(1988)將含有 Adh1-GUS之pAT13質體以PEG送入水稻Pi-4 及Taipei 309原生質體之中。在378個再生癒傷組織之中有61個具有GUS活性而在378棵再生植株之中86棵帶有GUS基因。由於pAT13質體帶有Adhl啓動子可在無氧下被誘導。某些轉殖水稻的根部GUS活性在無氧狀況下可增加5～6倍。Datta *et al.*, (1990)使用PEG6000將抗hygromycin的CaMV35s-*hph* 基因送入水稻原生質體中得到77棵轉殖水稻可抗hygromycin之特性，並可遺傳到子代。直接基因轉移到原生質體的方法能持續地發展使用乃因 *Agrobacterium* 轉移系統無法使用在單子葉植物上。而直接基因轉移法是唯一可產生轉殖穀類作物的方法。使用原生質體爲直接基因轉移材料比起另外的細胞材料具有關鍵性的優點；(1) 原生質膜在某些情況下可產生通透性使外來DNA可直接進入原生質體之中。(2) 外來基因有到達每一個 competent cells的機會，因而可增加由一定細胞數目中得到轉殖植物的機會。(3) 所有可獲得原生質體的植物都可用此法來行基因轉移而無單子葉、雙子葉之限制。有證據顯示直接基因轉移至原生質體外來基因會嵌入一個或一個以上的locus，且有依孟德爾遺傳律傳至下一代的現象，而且和植物原有基因一樣的穩定(Potrykus *et al.*, 1985)

3.基因槍(Gene Gun, Biolistic)

此法乃將DNA包在微小的鎢金屬微粒表面上(直徑4 μ m)，利用高速的投射器將鎢金屬微粒加速到430m/sec的高速使其能穿透植物組織的細胞壁進入細胞之中，同時

也將ＤＮＡ帶入植物細胞內。這個方法已成功的將含有CaMV35s-CAT的質體帶入洋蔥的表皮細胞(Klein *et al.*, 1987)。分析這些被撞擊的細胞發現有高度的ＣＡＴ活性表現。Wang *et al.*, (1988)將帶有Adhl-ＧＵＳ的質體送入水稻、小麥、大豆的細胞中都可以偵測到ＧＵＳ基因的表現。後續有利用大麥的培養細胞及未成熟胚爲材料分析ＣＡＴ基因的表現(Kartha *et al.*, 1989)及玉米的培養細胞送入ＧＵＳ及ＮＰＴII基因得到有ＧＵＳ表現及抗kanam ycin的再生癒合組織。並經南方墨點證實外來基因的存在(klein *et al.*, 1989)。利用此法射擊大豆未成熟胚的分生組織，2％從此分生組織分化出之植株表現了鑲嵌形式的ＧＵＳ或ＮＰＴII基因活性(McCabe *et al.*, 1988)。抗kanamycin的轉殖煙草植株也利用此法由葉片或培養的細胞而獲得(Klein *et al.*, 1988)。Fitch *et al.*, (1990)則以木瓜之未成熟胚及下胚軸爲材料轉移含有ＮＰＴＩＩ及ＧＵＳ的質體。經6～9個月的培養得到有ＧＵＳ表現及抗kanamycin的再生植株。Gordon-Kamm *et al.*, (1990)則將 *bar* 基因導入玉米胚培養懸浮細胞中得到的轉殖玉米具結實能力。在53株子代中有29株帶有 *bar*基因。將*bar*及ＧＵＳ基因共同轉移，而再生的癒傷組織，同時可表現此二個基因。由實驗報導來，基因槍方法操作容易，僅一次射擊便可造成許多細胞同時中彈，同時包在金屬微粒的ＤＮＡ進入細胞後仍具有生物活性；使用的材料不必是原生質體而可以是植物的組織、細胞、器官、分生組織或花粉 (Twell *et al.*, 1989)，而且沒有植物種類的限制。所以基因槍可能是可以產生穩定的單子葉作物轉殖植株的有效方法。

利用Biolistic 產生transient expression 的情況非常有效，但由 transient expression增進到stable integrative transformation 則是非常沒有效率的。在數千個轉移事件中僅有少數的stable integration發生(Potrykus, 1990)。不過由於其方便性，基因槍仍是具有潛力的轉移法。

4.微量注射法(Microinjection)

微量注射乃利用含有ＤＮＡ溶液的微小毛細管刺入特定的植物細胞或細胞核之中，而可將ＤＡＮ注入細胞(細胞核)內。微量注射須使用holding capillary system 來固定被注射物體，以利於微小毛細管行細胞內注射。被注射的物體可以是植物的原生質體(Lawrence and Davies, 1985)，細胞(Tokoda *et al.*, 1988)或者是小型的多細胞結構(Neuhaus *et al.*, 1987)。由於微量注射是以物理方法傳送ＤＮＡ，因此沒有植物種類之限制。微量注射最先選擇的是已形成部份細胞壁的原生質體。這在煙草(Crossway *et al.*, 1986)、苜蓿(Reich *et al* ., 1986)上有轉移成功的報導，而且被注射的細胞仍可存活及生長。雖然其轉移的機率很高(14％～16％)，但能處理的細胞量很少，因此能再生的轉殖植株數目便更少了。微量注射同樣也可用於注射有完整細胞壁的細胞，胡蘿蔔的懸浮培養及番茄的單一癒傷組織細胞(Toyoda. *et al.*, 1988)都有成功的報導。但尙無明顯分子上證據證明有穩定轉移現象。有些例子則是將ＤＮＡ注入小孢子、胚珠、未成熟胚等具有高度再生能力或胚發生的細胞中 (Neuhaus and Spangenberg, 1990)。Neuhaus *et al.*, (1987) 利用此法將含ＮＰＴII之質體注人油菜的八個細胞期的擬胚中。然後利用微培

養使其發育爲植株。經由dot blot檢查發現轉移率在27～51％。並且發現這些轉殖植株的轉形是嵌合的形式。

和基因槍相較之下，微量注射法一次只能注射一個細胞，而且操作上須要更多經驗及技巧，但不可否認的微量注射法有其好處：(1) 其對ＤＮＡ的傳送是很準確，通常可將ＤＮＡ直接送入細胞核中因而增加ＤＮＡ嵌入染色體之機會。(2) 只有幾個細胞且具有高度再生能力的微小結構如小孢子(micro-spore)及合子(zygote)來的原胚(proembryos) 都可以是注射對象。(3) 許多植物的zygotic proembryos都可分離得到且可培養成植株。因此減少了再生的培養困難。但對於多細胞結構行微量注射可能只產生嵌合的轉殖植物(Neuhaus *et al.*, 1987) 。因爲只有一些接受到外來基因的細胞會有ＤＮＡ嵌入染色體組的可能產生。而且也無法預見這些轉形細胞會對植物體的發育有所改變。因此，只有去分析這些轉形細胞的後代的表現才能評估對細胞組織行微量注射來轉移基因的價值(Potrykus, 1990)。

5.巨量注射法(Macroinjection)

此法乃利用比細胞尺寸還大的注射針將ＤＮＡ送入植物組織的傷口內，同時也破壞和注入ＤＮＡ接觸的細胞。因此ＤＮＡ須轉移到和傷口鄰接的細胞中才有嵌入植物染色體組的可能，因此如同將植物組織浸入ＤＮＡ溶液來企圖造成ＤＮＡ轉移的方法一樣產生了許多疑問。De La Pena *et al.*,(1987) 將ＮＰＴII基因注入到黑麥減數分裂發生前14天的花芽分生組織中，然後去檢視這些花芽產生的種子發現有些種子具有ＮＰＴII的活性且由southern blot證明基因的嵌入，但在後來對水稻、小麥、玉米做的大規模實驗則無任何轉殖植物產生(Potrykus, 1990)，所以巨量注射法似乎不是一個穩定有效率的轉移方法且仍具有爭議性存在。

6.花粉管途徑法(Pollen tube pathway)

Luo & Wu (1989)將水稻授粉後使花粉管發育至適當時機，切去花柱將含有CaMV 35S-ＮＰＴII基因的ＤＮＡ溶液滴在切口，他們認爲ＤＮＡ可沿著花粉管而進入胚珠中。由這些處理植株結出的種子中有20％帶有ＮＰＴII的活性。且由southern及slot blot 證實有雜交的訊號出現。然而Potrykus(1990)認爲其南方墨點的數據未能證明ＮＰＴII基因有嵌入高分子量ＤＮＡ之中，因爲其使用整個質體爲probe 而不是定義出一適當的片段作爲雜交反應的probe。且ＮＰＴII 酵素活性的分析在此並不可靠，因爲ＮＰＴII的活性測試有許多虛假的正反應(false pastive) 的記錄存在，他認爲很難去評論這個系統是否管用。因爲花粉管並非一個中空的管子，而是有callose 形成的「塞子」填充於其中，所以滴入的ＤＮＡ可能被細胞壁所「捕捉」而花粉管及synergids也可能有nuclease 來破壞ＤＮＡ。但這個方法仍值得進一步的試驗。

馬鈴薯基因轉移之研究

馬鈴薯基因轉移之研究至今大都以 *Agrobacterium* 來做轉移的工作。只有 Masson *et al.*,

(1989)利用電穿孔法將基因轉移得到二倍體轉殖馬鈴薯。Jones *et al.*, (1989)則僅止於使用電穿孔法轉移基因到馬鈴薯原生質體分析其transient expression。

Ooms *et al.*, 在1983 年使用野生型*A. tumefaciens*感染栽培種馬鈴薯Maris Bard 的莖段。在35個經感染的莖段中有4個存有T-DNA表現出的反應，但全部都無法長出根部。Ooms *et al.*, (1985)則利用*A. rhizogenes*感染栽培品種 Desiree 的莖段，在2～3週之後由感染的地方長出根群。由這些根群誘導出的一些癒傷組織分化出芽梢並可再生成完整植株。一部分的再生植株染色體組DNA經以雜交反應證明Ri DNA 的存在。這些轉形植株的外表型一致但和原有之Desiree 有很大的差異。這些再生轉殖植株有較多的根，輕微皺縮但有光澤的葉及較明顯的芽眼。Ooms *et al.*, (1987)利用二種*Agrobacterium*品系，一帶有NPTII基因的disarmed T-DNA，另一是shoot inducing strain 混合培養去感染栽培種Maris Bard 及 Desiree 的莖段。但得到的六株轉形植物之四株爲aneuploid ，另外有一株爲47個染色體，而非正常的48個。Tavazza *et al.*, (1988)也把含有NPT-II基因的disarmed Tiplasmid (pGA492)用*A. tumefaciens*感染Desiree的葉圓片。同時也使用feederlayer 的技術來培養葉圓片，在四週內便可得到可抗kanamycin 的轉殖馬鈴薯，且外觀正常，這比一般的轉移程序快得多，他也認爲良好的再生培養環境是得到高轉形率的基本條件。

DeBlock (1988) 使用數個不同栽培品種－Bintje、Berolina、Desiree、Russet Burbank切傷葉片爲材料。然後和帶有NPTII或*bar*基因之disarmed 質體之不同*Agrobacterium*共同培養，這些品種的馬鈴薯葉子都能在感染後在含有kanamycin 的培養基上長出癒傷組織，且幾乎所有的癒傷組織都能分化出芽梢。分析這些轉殖植物發現帶有一至數個T-DNA ，且能表現出NPTII及抗殺草劑phosphinot ricin (*bar*基因產物)之特性。轉殖植物可在高劑量殺量劑phosphinotricin 的處理下存活生長。依De Block(1988)使用一系列不同培養基的培養系統可在7-10週內得到轉形植株且少有變異發生。Wenzler *et al.*, (1989) *A. tumefaciens*帶有CaMV35S-GUS 及nos-NPTII的disarmed質體pBI 121或 paptine-GUS的pBS20 A-G質體去和Desiree、Superior、Russet Burbank、FL1607等品種共同培養都可得到轉殖馬鈴薯，由pBI 121 來的轉殖馬鈴薯之間的GUS活性有20倍以上之差異。而paptine-GUS轉移的轉殖馬鈴薯在薯球有很高的GUS基因活性。

除了葉片莖段爲轉移材料外，也有以薯球切片爲轉移材料的報導。 Stiekema *et al.*,(1988)使用栽培種Bintje，Desiree 薯球切片和含有CAmv35s-gus 及nos-NPTII disarmed Ti plasmid pBI 121的*Agrobacterium*共同培養在含有kanamycin培養基中長出之轉殖植株經分析都有GUS基因之表現且沒有變異產生。Ishida et al., (1989) 同樣用pBI121 Ti質體以*A. tumefacines*感染栽培種Russet Burbank及Lemhi Burbank的薯球切片也得到相同結果。Sheerman & Bevan(1988)則以 Plantland Dell，Desiree，Maris Piper，Maris Bard 及 Golden Wander 品種之1～2mm薯球切片爲材料和含有nopoline synthase基因之pBIN6 Ti質體的*A. tumefacines*共同培養都得到可產生nopline的轉殖馬鈴薯。

除了使用*A. tumefaciens*爲轉移系統，在*A. rhizogenes*爲轉移系統也有轉殖馬鈴薯成功的報導。Haeneisch *et al.*,(1988) 將栽培種Desiree及Bintje 的葉圓片及薯球切片和*A. rhizogenes*共

同培養，有10％經由感染後根群來的癒傷組織分化出芽梢。其中26個芽梢是Bintje 品種，13芽梢爲Desiree品種，都具有opine形成的反應，除Desiree有一個芽梢爲八倍體，其它再生的芽梢都是四倍體。所有Bintje 品種的轉殖植株外表皆有變異，而Desiree品種則全部正常，但其薯球的形狀及大小卻有變異。Vesser *et al.*, (1989) 也使用帶有野生型Ri質體及含有ＮＰＴＩＩ及ＧＵＳ基因之binary vector (pBI 121)的A. rhizogenes 對八個二倍體品種做轉移試驗。八個品種都可得到hairyroot clone 及再生轉殖枝條，其中58％的再生芽梢爲四倍體，38％爲二倍體。這些轉殖植株生長在含有kanamycin 的培養基上且比不在含有kanamycin 的培養基上有更長的根系。由opine，ＮＰＴII，ＧＵＳ活性的測定及南方雜交法證實基因轉移的成功且有數個Ｔ-ＤＮＡ及Ｒｉ-ＴＤＮＡ嵌入的情形。分析其子代發現所有的轉移都可遺傳至下一代。除了使用篩選標誌基因及報導基因做轉移試驗之外，Sijmons *et al.*, (1990)將帶有CaMV35S Ｓ-ＨＳＡ(human serum albumin) binary ＨＳＡ expression vector 的 *Agrobacterium* 感染 Desiree的葉圓片。由北方墨點及西方墨點證明再生的轉殖植株有ＨＳＡ的產生。Hoekema *et al.*, (1989)則將Potato Virus X （ＰＶＸ） 的coat protein（ＣＰ）基因構築在 CaMV35S promoter之後剪接在pPVX 102 disarmed　Ti 質體，並送入*A. tumefaciens* 中和栽培種 Bintje、Desiree、Escorr的薯球切片做共同培養。Sijmons *et al.*, (1989)將五棵產生 coatprotein 高於葉片可溶性蛋白0.1％的轉殖植株接種ＰＶＸ病毒。這些轉殖植物病徵出現的時間比平常延後且病毒累積量明顯降低。Sijmons (1990) 發現ＣＰ基因表現與病毒累積程度呈負相關。在選取62棵轉殖馬鈴薯做細胞檢定，發現97％爲正常的四倍體，且形態正常。而形態不正常的一棵經細胞檢定發現爲八倍體。

除了在實驗室的轉移試驗某些轉殖馬鈴薯已移到室外行田間試驗。De Greef *et al.*, (1989)將產生phosphinothricin acetyl transferase（ＰＡＴ）的 *bar* 基因，利用 *A. tumefaciens* 轉移到Bintje、Berolina、Desiree 等栽培種的葉圓片。再生植株經溫室試驗發現這些轉殖植株都能抵抗glufosinate 和 bialaphos 殺草劑的施用。移到田間試驗時轉殖植株同樣顯示出耐藥性。經過檢查發現雖然這些植物表現ＰＡＴ的程度有10倍的差異，但都能忍受 glufos inate 的一般田間施用劑量。Lawson *et al.*, (1989)則將 Potato Virus X（ＰＶＸ）及Potato Virus Y（ＰＶＹ）之coat protein基因利用 *A. tumefaciens* 送入栽培種 Russet Burbank 之中。Kaniewske *et al.*, (1989)則將此轉殖植物移至田間試驗發現ＰＶＸ及ＰＶＹ ＣＰ gene 非常高的clone303 能抵抗高量病毒感染。而且在ＰＶＸ及ＰＶＹ接種之後 clone 303 薯球產量沒有減少而對照組的產量則減低。在未接種病毒時這些轉殖馬鈴薯的產量和未接種的對照組相當。這顯示經轉殖抗ＰＶＸ及ＰＶＹ的馬鈴薯在田間能有效抵禦ＰＶＸ及ＰＶＹ的複合感染而不至於有產量減少的情形。

在眾多以 *Agrobacterium* 轉移基因至馬鈴薯的報導之外，只有 Masson *et al.*, (1989)使用電穿孔直接將抗kanamycin的pABD1 質體、抗hygromycin的pCe 140質體及抗 chlorsrlf uron的pEGH1質體以250v/cm，16 μ F的電擊條件轉移至5種二倍體馬鈴薯。這五種馬鈴薯分別爲clone 45，90，71，217及275。經培養後colone 45 得到一個抗kanamycin的轉殖植株（45ＫＲ）。Clone 90則得到一抗 kanamycin（90ＫＲ）及一抗(hygromycin)植株(90ＲＨ)。Clone 71得到一

抗 chlorsulfuron 的轉形植株(71CHR)，clone 217 則得到一抗kanamycin的轉形植株（217ＫＲ）。Masson *et al.*, (1989) 抽取90ＫＲ及90ＨＲ植株ＤＮＡ，進行南方雜交發現轉移進入的ＤＮＡ有重組的現象，90ＫＲ有1～2 copies 的質體而90ＨＲ有5 copies的質體嵌入植物染色體組之中。Masson *et al.*, (1989) 並將這些轉殖馬鈴薯的原生質體融合（90ＨＲ＋90ＫＲ）後，可藉由抗藥性及抗殺草劑的篩選而得到四倍體的細胞融合體。Jones *et al.*,(1989)也使用電穿孔轉移法將CaMV35S-GUS、paptine-ＧＵＳ等基因導入野生種*Solanum brevides*葉肉細胞原生質體及栽培種Desiree葉肉細胞、懸浮培養細胞及薯球的原生質體，並分析這些基因的transient expression。調查CaMV35S-ＣＡＴ導入原生質體的表現時顯示依電穿孔時使用的field strength及pulse time的不同而表現不同的ＣＡＴ活性。當在85ms pulse time 情況下，*S. brevides*葉肉細胞原生質體在250v/cm，Desiree葉肉細胞原生質體在225v/cm，懸浮培養細胞原生質體在225v/cm，薯球原生質體在150v/cm可得最好的ＣＡＴ基因表現。以 Desiree 葉肉細胞原生質體所做的試驗顯示ＣＡＴ基因的表現在電穿孔後36～38小時表現最高，而使用 paptine-ＧＵＳ爲轉移基因時顯示當ＤＮＡ濃度在1～10 pmole/ml時paptine promoter產生的ＧＵＳ活性和CaMV-35S promoter的ＧＵＳ活性類似。當ＤＮＡ濃度提高至20～30 pmole/ml時 paptine promoter的ＧＵＳ活性則比CaMV-35S promoter高出4～5倍。

十字花科蔬菜基因轉移研究現況

十字花科蔬菜大部份可被*Agrobacterium tumefaciens*及*A. rhizogenes*感染 (Cleene and Leu, 1981；Tanaka *et al.*, 1985) *A. tumefaciens*轉移ＮＰＴII基因到*B. napus*之組織培植體，且組經生培養成植株已有報導(Crossway *et al.*, 1986)。利用*A. rhizogenes*轉移ＮＰＴII基因到*B. napus*且偵測到有 opine 之產生；誘導產生之根亦能再生成有活力之植株。根據 Slightom *et al.*,(1985)之報告，*A. tumefaciens*及 *A. rhizogenes*具有相似之轉移機制，其不同之處在於 *A. rhizogenes*產生之根較易再生成植物，而A. tumefaciens 產生之腫瘤不易再生。*A. rhizogenes*產生根之生理並不清楚，誘導產生之根容易發生變異。經*A. rhizogenes*轉型之 rapeseed 之根生長快速、多分支、且有橫向性(Tepfer，1983；1984)。由分其後代表現轉移基因之特性顯示，其遺傳行爲是符合孟德爾遺傳法則。

除了以間接轉移之方法外，利用直接基因轉移方法所得之轉形*B. campestris*具有抗kanamycin之能力(Potrykus *et al.*, 1985)。根據 Golz *et al.*,(1990)報導，從*B. nigra*抗 hygromycin之 callus line分離其ＤＮＡ，以ＰＥＧ之方法成功的轉移到*B. napus*原生質體，其相對轉移率爲0.1～0.4％。Chapel＆Kristina(1990)將*B. napus*之葉肉原生質體，經由電孔去及配合細胞壁抑制劑2,6-dichloro-benzonitrile(2,6-ＤＢ)及5％ＰＥＧ，將嵌合之ＧＵＳ基因送入原生質體中。2,6-ＤＢ是一化合物作爲殺草劑之用，其可能是抑制細胞壁之合成。利用此抑制劑及電孔法能加强ＧＵＳ基因轉移到rapeseed之葉肉原生質體 (Shillito *et al.*, 1985；Fromm *et al.*, 1985)。

近年來亦有利用*A. tumefaciens*及電孔法轉移ＣＡＴ基因到幾種蕓苔屬之成功例子 (Charest

et al., 1988；Pua *et al.*, 1987)。利用ＣＡＴ作爲報導基因在某些蕓苔屬 *B. campestris*，*B. napus* 及*B. oleracea* 內有很高內生ＣＡＴ活性(Balazs and Bonneville，1987)。然而發現有抑制ＣＡＴ活性出現之因子存在於轉形之*B. napus*及 *B. juncea*。因此在轉形之 *B. napus*則不易測出ＣＡＴ之活性。

大多數蕓苔屬可以被cauliflower mosaic virus（CaMV）所感染，它是一種ＤＮＡ virus，可作爲基因載體(Hohn *et al.*, 1985)。CaMV基因組有二個區域並非感染所必需其爲ＯＲＦ II及VII，所以此部分可以去除或加以改造，插入一小部分外來的ＤＮＡ(Gronenb orn *et al.*, 1981)。根據Brisson *et al.*, (1984) 報導將CaMV ORFII區域以Ｒ67載體接上 dihydrofolate reductase（ＤＨＦＲ）基因取代，此基因在 *E. coli*證實有抗methotrexate。利用此嵌合的病毒ＤＮＡ轉移ＤＨＦＲ基因，此病毒可以穩定在turnip 中複製，而且*dhfr*基因亦能在turnip 中表現，產生一具有功能酵素。同樣地以 *A. tumefaciens*轉移 *dhfr*基因到*B. napus*，亦得抗methotrexate之轉形植株。另外亦有從Tn5 得到 aminoglycoside (neomycin) phosphotrans-ferase typeII（APH (3')）II）取代ORF VI 基因，可作爲許多轉形植物篩選的標示基因。經由此修改過病毒基因感染　*B. campestris*原生質體，結果證實此嵌合之ＤＮＡ可進入植物之基因組中。

Misra and Gedamu(1990)構築動物之ＭＴ II基因(鎘結合蛋白質基因)到CaMN35S 之啓動子，經由*A. tumefaciens*方法轉移到*B. napus*及 *N. tabacum*細胞中。所獲得之轉殖植株可生長在含有0.1mM $CdCl_2$ 之培養基中，而對照組卻有嚴重根及莖生長抑制現象。且轉形植株之後代亦有耐重金屬之特性出現，其遺傳行爲符合孟德爾之遺傳率。

參考文獻

Bevan, M. W., R. B. Flavell and M. D. Chilton. 1983. A chimeric antibiotic resistance gene as a selectable marker for plant cell transformation. Nature 304:184-187.

Binns, A. N. 1990. Agrobacterium-mediated gene delivery and the boiology of host range limitation Physiologia Plantarun 79:135-139.

Brisson, N., J. Paszkowski, J. R. Penswick, B. Gronenborn, I. Potrykus and T. Hohn. 1984. Expression of a bacterial gene in plants by using a viral vector. Nature 310:511-514.

Chapel, M. and K. Glimelius. 1990. Temporary inhibition of cell wall synthesis improves the transient expression of the GUS gene in *Brassica napus* mesophyll protoplasts. Plant Cell Rep. 9: 105-108.

Charest, P. J., L. A. Holbrook, J. Gabard, V. N. Iyer and B. L. Miki. 1988. Agrobacterium mediated transformation of thin cell later explants from *Brassoca napus* L. Theor. Appl. Genet. 75(3):438-445.

Cleene, M. De. and J. De. Leu. 1981. The host range of infectious hairy-root *Agrobacterium rhizogenes.* Bot. Rev. 47:147-194.

Crossway, A., J. V. Oakes, J. M. Irvine, B. Ward, V. C. Knauf and C. K. Shewmaker. 1986. Integration of foreign DNA folling microinjection of tobacco mesophyll protoplasts. Mol. Gen. Genet. 202:179-185.

Datta, S. K., A. Peterhans, K. Datta and I. Potrykus. 1990. Genetically engineered fertile indica -rice recovered from protoplasts. Bio/Technology. 8:7 36-740.

Davey, M. R., E. C. Cocking, J. Freeman, N. Pearce and I. Tudor. 1980. Transformation of *Petunia* protoplasts by isolated *Agrobacterium* plasmid. Plant Science. 18:307-313.

Davey, M. R., E. L. Rech and B. J. Mulligan. 1989. Direct DNA transfer to plant cells. Plant Mol Biol. 13:273-285.

De Block, M. 1988. Genotype-independent leaf disc transformation of potato (*Solanum tuberosum*) using *Agrobacterium tumefaciens.* Theor. Appl. Genet. 76 :767-774.

De Greef, W., Rene Delon, De Block M, J. Leemans and J. Botterman. 1989. Evaluation of herbicide resistance in transgenic crops under field conditions. Bio/Technology. 7:61-67.

De la Pena, A., H. Loerz and J. Schell. 1987. Transgenic rye plants obtained by injecting DNA into young floral tillers. Nature. 325:274-276.

Draper J., R. Scott, A. Kumar and G. Dury. 1988. Plant gene transforation and gene expression. A Laboratory munual. J. Draper, R. Scott. and P. Armit age(eds). Blackwell Science Public. Oxford pp: 163-198.

Fitch, M. M. M., R, M. Mabshardt, D. Gonsalves, J. L. Slightom and J. C. Sanford. 1990. Stable transformation of papaya via microprojectile bombardment. Plant Cell Rep. 9:189-194.

Fromm, M., L. P. Taylor and V. Walbot. 1985. Expression of genes transferred into monocot and dicot plant cells by electroporation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:5824-5828.

Golz, C., F. Kohler and O. Schieder. 1990. Transfer of hygromycin resistance into *Brassica napus* using total DNA of a transgenic *B. nigra* line. Plant Mol. Biol. 15:475-483.

Gordon-Kamm, W. J., T. M. Spencer, M. L. Mangano and T. R. Adams. 1990. Transformation of maize cell and regeneration of fertile transgenic plants. The Plant Cell. 2:603-618.

Gronenborn, B., R. C. Gardner, S. Schaefer and R. J. Schepherd. 1981. Propagation of foreign DNA in plants using cauliflower mosaic virus as vector. Nature 294:773-776.

Guerche, P., M. Charbonnier, L. Jouanin, C. Tourneur, J. Paszkowski and G. Pelletier. 1987. Direct gene transfer by electroporation in *Brassica napus*. Plant Science. 52:11-116.

Haenisch ten Cate Ch H., E. Ennik, S. Roest, K. S. Ramulu, P. Dijkhuis and De Groot B. 1988. Regeneration and characterization of plants from potato root lines transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. Theor. Appl. Genet. 75:452-459.

Hoekema, A., M J. Huisman, L. Molenijk, Elzen PJM van den and B. J. C. Cornelissen. 1989. The genetic engineering of two commerial potato cultivars for resistance to potato virus X. Bio/Technology. 7:273-278.

Hohn, T., B. Hohn and P. Pfeiffer. 1985. Reverse transcription in CaMV. Trends. Biochem. Sci. 10:205-209.

Ishida, B. K., G. W. Snyder, Jr, and W. R. Belknap. 1989. The use of in vitro-grown microtuber discs in Agrobacterium-mediated transformation of russet burbank and lemhi russet potatoes. Plant Cell Rep. 8:325-328.

Jones, H., G. Ooms and M. G. K. Jones. 1989. Transient gene expression in electroporated *Solanum* protoplasts. Plant Mol. Biol. 13:503-511.

Kaniewske, W., C. Lawson, B. Sammons, L. Haley, J. Hart, X. Delannay and N. E. Tumer. 1990 Field resistance of transgenic russet burbank potato to effects of infection by potato virus X and potato virus Y. Bio/Technology. 8: 750-754.

Kartha, K. K., R. N. Chibbar, F. Georges, N. Leung, K. Caswell, E. Kendall and J. Qureshi. 1989. Transient expression of chloramphenicol acetyltransferase (CAT) gene in barley cell culturases and immature embryos through microprojectile bombardment. Plant Cell Rep. 8:429-432.

Klein, T. M., L. Kornstein, J. C. Sanford and M. E. Fromm. 1989. Genetic transformation of maize cells by particle bombarment. Plant Physiol. 91:440-444.

Klein, T. M., E. D. Wolf, R. Wu and J. C. Sanford. 1987. High-velocity microprojectiles for devrliving nucleic acids into living cells. Nature 327:70 -73.

Klein, T. M., E. C. Harper, Z. Svab, J. C. Sanford and M. E. Fromm. 1988. Stable genetic

tansforation of intact Nicotina cells by particle bombardment process. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:8502-8505.

Krens, F. A., L. Molendijk, G. J. Wullems and R. A. Schilperoort. 1982 In vitro transformation of plant protoplasts with Ti-plasmid DNA. Nature 296: 72-74.

Lawrence, W. A., D. R. Davies. 1985. A method for the microinjection and culture of protoplasts at very low densities. Plant Cell Rep. 4:33-35.

Lawson, C., W. Kaniewski, L. Haley, R. Rozman, C. Newell, P. Sanders and N. E. Tumer. 1990 Engineering resistance to mixed virus infection in a commerical potato cultivar : resistance to potato virus X and potato virus Y in transgenic russet burbank. Bio/Technology 8:127-134.

Lindesy, K. and M. G. K. Jones. 1990. The cell biology of genetic engineering. In: Plant biology in agriculture. K. Lindsey, M. G. K. Jones (eds). Prentice hall. Engllewood Cliffs. New Jersey. pp: 94-127.

Luo, Z. X. and R. Wu. 1989. A simple method for the transformation of rice via the pollen-tube pathway. Plant Mol. Biol. Report 7:69-77.

Masson, J., D. Lancelin, C. Bellini, M. Lecerf, P. Guerche and G. Pelletier. 1989. Selection of somatic hybrids between dipoloid clones of potato *(Solanum tuberosum* L.*)* transformation by direct gene transfer. Theor. Appl. Genet. 78 :153-159.

McCabe, D. E., W. F. Swain, B. J. Martinell and P. Christou. 1988. Stable transformation of Soybean (Glycine max) by particle acceleration. Bio Technolog y 6:923-926.

Misra, S. and L. Gedamu. 1990. Heavy metal resistance in transgenic plants expressing a human metallothionein gene. In: C. J. Lamb and R. N. Beachy (eds.), Plant Gene Transfer. New York. pp. 257-265.

Negrutium, I., R. Shillito, I. Potrykus, G. Biasini and F. Sala. 1987. Hybrid genes in the analysis of transformation conditions 1. Setting up a simple method for dierct gene transfer in plant protoplasts. Plant Mol. Biol. 8:363-373.

Neuhaus, G., E. Kranz, G. Spangenberg and H. G. Schweiger. 1987. Transformation of *Nicotiana tobacum* and *Brassica napus* by microindection into protoplasts. Eu r. J. Cell Biol. 43:39.

Neuhaus, G., G. Spangerberg, M. O. Scheid and H. G. Schweiger. 1987. Trangic rape seed plants obtained by the microinjection of DNA into microspore- derived embryoids. Theor. Appl. Genet. 75:30-36.

Neuhaus, G. and G. Spangenberg. 1990. Plant transformation by microinjection techniques. Physiologia Plantarum 79:213-217.

Ooms, G., A. Karp, M. M. Burrell, D. Twell and J. Roberts. 1985. Genetic modification of potato development using Ri-T-DNA. Theor. Appl. Genet. 70:440-446.

Ooms, G., M. M. Burrell, A. karp, M. Bevan and J. Hille. 1987. Genetic transformation in two potato cultivars with T-DNA from disarmed *Agrobacterium.* Theor. Appl. Genet. 73:744-750.

Pazkowsk, J., R. D. Shillito, M. Saul, V. Mandak, T. Hohn, B. Hohn and I. Potrykus. 1984. Direct gene transfer to plants. EMBOJ. 3:2717-2772.

Potrykus, I., J. P. Paszkowski, M. W. Saul, J. Petruska and R. D. Shillito. 1985. Molecular and general genetics of hybride foreign genes introduced into tobacco by direct gene transfer. Mol. Gen. Genet. 199:169-177.

Potrykus, I., R. S. Shillito, M. W. Saul and J. Paszkowski. 1985. Direct gene transfer. State of the art and furture potential. Mol. Biol. Rep. 3:117-128 .

Potrykus, I. 1990. Gene transfer to plants : assessment and perspectives. Physiol. Plant 79:125-134.

Pua, E. C., A. Mehra-Palta, F. Nagg and N. H. Chua. 1987. Transgenic plants of *Brassica napus* L. Bio/Technology. 5:815-817.

Reich, T. J., V. N. Iyer and B. L. Miki. 1986. Efficient transformation of alfafa protoplasts by the intranuclear microinjection of Ti plasmids. Bio/Tcchnology 4:1001-1004.

Rhodes, C., I. Pierce, D. Mettler, D. Masarennas and J. Detmer. 1988. Genetically transformed maize plants from protoplasts. Science. 240:204.

Sheerman, S. and M. W. Bevan. 1988. A rapid transformation method for *Solanum tuberosum* using binary *Agrobacterium tumefaciens* vectors. Plant Cell Rep. 7:13-16.

Shillito, R. D., M. W. Saul, J. Paskowski, M. Mueller and I. PotryKus. 1985. High efficiency direct gene transfer to plants. Bio/Trechology 3:1099-1103.

Sijmons, P. C., B. M. M. Dekker, B. Schrammeijer, T. C. Vervoerd, Elzen PJM van den and A. Hoekema. 1990. Production of correctly processed human serum albumin in transgenic plants. Bio /Tcchnology 8:217-222.

Slightom, J. L., L. Jouanin, F. Leach, R. Drong and D. Tepfer. 1985. Isolation and identification

of T-DNA plant junction in *Convolvulus arvensis transferred* by *Agrobacterium rhizogenes* strains A4. EMBO J. 4:3069-3077.

Stiekema, W. J., F. Heidekamp, J. D. Louwerse, H. A. Verhoeven and P. Dijkhuis. 1988. Introduction of foreigen genes into potato cultivars bintje and desiree using an *Agrobacterium tumefaciens* binary vector. Plant Cell Rep. 7:47-50.

Tagu, D., C. Bergounioux, C. Perennes and P. Gadal. 1990. Inheritance of two foreign genes co-introduced into Petunia hybrida by direct gene transfer. Plant Cell Tissue Organ Culture 21: 259-266.

Tanaka, N., M. Hayakawa, Y. Mano, H. Ohkawa and C. Matsui. 1985. Infection of turnip and radish storage roots with *Agrobacterium rhizogenes.* Plant Cell RE p.4: 47-77.

Tavazza, R., M. Tavazza, R. J. Ordas, G. Ancora and E. Benvenuto. 1988. Genetic transformation of potato *(Solanum tuberosum)* : an efficient method to ob taintransgenic plants. Plant Science 59 :175-181.

Tepfer, D. 1984. Transformation of several species of higher plants by *Agrobacterium rhizogenes* : sexual transmission of the transformed gentype and phenotype. Cell 37:959-967.

Tepfer, D. 1983. The potential uses of *Agrobacterium rhizogenes* in the genetic engineering of higher plants. Nature got there first. In: P. F. Lurquin and A. Kleinhofs (eds). Genetic engineering in *Eukaryotes.* Plenum Press, New York, London pp. 153-164.

Toyoda, H., Y. M. Atsuda, R. Utsumi and S. Ouchi. 1988. Intranuclear microinjection of tomato callus cells. Plant Cells Rep. 7:293-296.

Twell, D., T. M. Klein, M. E. Fromm and S. McCormick. 1988. Transient expression of chimeric genes deliveres into pollen by microprojectile bombardment. Plant Physiol. 91:1270-1274.

Visser, R. G. F., A. Hesseling-Meinders, E. Jacobsen, H. Nijdam and B. Witholt. 1989. Expression and inheritance of inserted markers in binary vector carrying *Agrobacterium rhizogenes*-transformed potato *(Solanum tuberosum* L.). Theor. Appl. Genet. 78:705-714.

Wang, Y-C., T. M. Klein, M. Fromm, J. Cao, J. C. Sanford and R. Wu. 1988. Transient expression of foreign genes in rice, wheat and soybean cells following particle bombardment. Plant Mol. Biol 11:433-439.

Wenzier, H., G. Migenry, G. May and W. Park. 1989. A rapid and efficient transformation method for production of large numbers of transgenic potato plants Plant Science. 63:79-85.

Wilson, S. M., T. A. Thorpe and M. M. Moloney. 1989. PEG-mediated expression of GUS and CAT genes in protoplasts from embryogenetic suspension cultures of *Picea glauca.* Plant Cell Rep. 7: 704-707.

Zhang, H. M., H. Yang, E. L. Rech, T. J. Golds, A. S. David, B. J. Mulligan, E. C. Cocking and M. R. Davey, 1988. Transgenic rice plants produced by electroporation-mediated plasmid uptake into protoplasts. Plant Cell Rep. 7:379-384.

Zimmermann, V. 1986. Electrical breakdown, electropermeabilization and electrofusion. Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 105:175-255.